

**VORKOMMEN UND VERBREITUNG WICHTIGER
DURCHFALLERREGER BEI NEUGEBORENEN KÄLBERN
IN SÜDDEUTSCHLAND IM ZEITRAUM 1984 BIS 1986**

MICHAEL WOLF

Disbui. München

1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554822_0058

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
Infektions- und Seuchenmedizin der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Vorstand: Prof.Dr.Dr.h.c.mult. Anton Mayr

angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. H.
Mahnel

VORKOMMEN UND VERBREITUNG WICHTIGER DURCHFALLERREGER
BEI NEUGEBORENEN KÄLBERN IN SÜDDEUTSCHLAND IM ZEIT-
RAUM 1984 BIS 1986

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Michael Wolf
aus
Freudenstadt
München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. H. Mahnel

Korreferent: Priv. Doz. Dr. Dr. habil. W. Klee

Tag der Promotion: 27. Februar 1987

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite:

1.	EINLEITUNG	1
2.	SCHRIFTTUM.....	2
2.1.	<u>Verbreitung wichtiger Infektions- erreger bei Kälberdurchfällen</u>	2
2.1.1.	Rotaviren	2
2.1.2.	Coronaviren	3
2.1.3.	Enterotoxische E. coli-Keime	4
2.1.4.	Kryptosporidien	5
2.2.	<u>Mischinfektionen</u>	6
2.3.	<u>Nachweisverfahren</u>	8
2.3.1.	Rota- und Coronaviren	8
2.3.2.	Enterotoxische E. coli-Keime	9
2.3.3.	Kryptosporidien	11
3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	13
3.1.	<u>Material und Methoden</u>	13
3.1.1.	Untersuchungsmaterial	13
3.1.2.	Anzüchtung	13
3.1.3.	K99-Nachweis im Mikro-ELISA	13
3.1.4.	Rotavirusnachweis im Mikro-ELISA	14
3.1.5.	Coronavirusnachweis im Hämaggluti- nationstest	15

Seite:

3.1.6	Nachweis von sporulierten Oozyten und Sporozysten der Kryptosporidien ...	15
3.2.	<u>Ergebnisse</u>	16
4.	BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	25
5.	ZUSAMMENFASSUNG	29
6.	SUMMARY	30
7.	LITERATURVERZEICHNIS	31

1. EINLEITUNG

Die neonatalen Durchfallerkrankungen der Kälber stehen seit Jahren im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. In vielen Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß weltweit vor allem Rota- und Coronaviren, enterotoxische *E. coli*-Keime (ETEC) und Kryptosporidien die wichtigsten infektiösen Ursachen sind (1, 3, 8, 10, 14, 15, 31, 42, 47, 52, 55, 60, 68, 73, 74). Dabei können beim Zustandekommen der Durchfallerkrankung diese Erreger auch zusammen wirken (36, 60, 74).

Das Vorkommen obiger enteropathogener Erreger bei Durchfallkälbern wurde für den süddeutschen Raum bereits früher bestätigt (14, 15). Diese Untersuchungen, sowie vergleichbare Untersuchungen aus anderen Regionen, beschränkten sich aber auf Untersuchungsmaterial aus einem relativ begrenzten Zeitraum bzw. nur auf den Nachweis von einem oder zwei Erregern.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals über einen längeren Zeitraum (2 1/2 Jahre) die Verbreitung von Rota- und Coronaviren, Kryptosporidien und enterotoxischen *E. coli*-Keimen untersucht. Da in vielen Problembeständen Süddeutschlands in den letzten Jahren, neben der *E. coli*-Schluckvaccine (13), vermehrt auch Muttertiervaccinen gegen Rota- und Coronaviren sowie *E. coli* K99-Keime eingesetzt wurden (8, 24), bot sich erstmals die Möglichkeit eventuelle Auswirkungen der Muttertier-Immunisierung auf das Erregerspektrum bei Durchfallkälbern zu studieren. Darüberhinaus wurden Einflüsse wie Jahreszeit, Alter der Kälber und Zeitpunkt der Probenentnahme auf das Vorkommen bzw. die Nachweishäufigkeit einzelner Erreger untersucht.

2. SCHRIFTTUM

2.1. Verbreitung wichtiger Infektionserreger bei Kälberdurchfällen

2.1.1. Rotaviren

Rotaviren wurden beim Kalb erstmals im Jahr 1969 in den U.S.A. nachgewiesen. Seither gelang es weltweit Rotaviren aus Kälberkotproben zu isolieren. Vor allem in den Kotproben von Kälbern mit Diarrhoe hatten die Rotavirus-positiven Proben einen relativ hohen Anteil von ca. 40 - 60%. Die Prozentsätze betrugen im einzelnen in den Niederlanden zwischen 44 und 54% (21, 46), in Frankreich 53% (61), in Spanien ca. 45% (70) und in Irland ca. 50% (54, 55). Regional unterschiedliche Ergebnisse wurden aus Großbritannien berichtet. Der Prozentsatz positiver Proben schwankte zwischen 50% bis 67% in Schottland (68, 79, 80), 42% in Südkontinent und Wales (60) und 66% in England (79, 80).

In der Bundesrepublik Deutschland wurde erstmals 1977 über das Vorkommen von Rotaviren bei Kälbern berichtet (9, 23). Bei einer Untersuchung im süddeutschen Raum ließen sich bei 40% der Kälber mit Durchfall im Kot Rotaviren nachweisen (14).

In Kanada waren 27% der Kotproben von durchfallkranken Kälbern positiv (1, 3, 42) und in den U.S.A. über 50% (49, 77). Bei gesunden Kälbern betrug der Anteil der Rotavirus-haltigen Kotproben ca. 12% (49).

Die Erfahrungen aus Belgien und Italien basieren nur auf dem indirekten Nachweis mittels Antikörperbestim-

mung. Die Untersuchungen bestätigen aber die ubiquitäre Verbreitung von Rotaviren bei Kälbern (18, 82).

Rotaviren wurden bei Kälbern am häufigsten in den ersten 14 Lebenstagen, mit einer Häufung zwischen dem 7. und 9. Lebenstag, nachgewiesen (4, 20, 21, 22, 50, 54, 78, 81). Nur gelegentlich fand man Rotaviren bei 30 Tage alten Kälbern (3). Eine genaue Altersabhängigkeit beschrieben Acres et al. (3). Danach waren nur 10% der mit Rotaviren infizierten Kälber jünger als 5 Tage, 40% bzw. in einer Untersuchung sogar mehr als 90% (1) zwischen 5 und 10 Tage alt und nur 10% älter als 10 Tage. Jahreszeitliche Häufungen im Rotavirusnachweis gab es nicht (21).

2.1.2. Coronaviren

Nach der erstmaligen Beschreibung in den U.S.A. durch Mebus et al. (44) im Jahr 1973 wurden Coronaviren aus Kälberkotproben in vielen Ländern Europas, der U.S.A., Kanada, Neuseeland (37), Japan (64) und der UdSSR (69) isoliert, so daß auch bei diesem Erreger von einer weltweiten Verbreitung ausgegangen werden kann. Die niedrigsten Nachweisraten wurden dabei aus England berichtet. Der Prozentsatz Coronavirus-positiver Proben bewegte sich zwischen 6% und 14% (60, 63). In Holland waren dagegen bis zu 16% (22) und in Spanien bis zu 18% (70) der untersuchten Proben Coronavirus-positiv.

Für Kanada wurden in Durchfallproben Prozentzahlen zwischen 11 bis 29% (42, 52) und in den U.S.A. sogar

zwischen 16 und 58% (41, 49) beschrieben. In den zum Vergleich mituntersuchten Kotproben gesunder Kälber waren entweder keine (49, 53, 60) oder nur zu einem geringen Prozentsatz (68) Coronaviren zu finden.

Bezüglich der Altersabhängigkeit von Coronavirus-Infektionen liegen unterschiedliche Ergebnisse vor. Allgemein kam es aber zu einer Häufung der positiven Kälber in den ersten 14 Lebenstagen (1, 41, 46, 60). In den Untersuchungen von Langpap et al. (41) waren 25 % der Corona-positiven Kälber jünger als 7 Tage und 18 % der Kälber erst 1 Tag alt.

2.1.3. Enterotoxische E. coli-Keime

Die Nachweisraten für enterotoxische E. coli-Keime schwankten am stärksten. Alle Untersuchungen konzentrierten sich bisher auf enterotoxische E. coli-Keime mit dem K99-Antigen. Die niedrigsten Wertestammten aus England, wo enterotoxische E. coli-Keime nur in 3% bis 8 % der Durchfallproben isoliert werden konnten (60, 63). Zum Teil wesentlich höhere Anteile wurden aus den anderen Ländern berichtet (1, 2, 3, 14, 21, 22, 40, 43, 49, 57, 76). So lagen die höchsten Prozentsätze K99-positiver Kotproben in der Bundesrepublik Deutschland bei 37% (14), in Holland bei 19 % (21, 22), in den U.S.A. bei 69% (49) und in Kanada bei 28% (1, 2, 3).

Am häufigsten fand man E. coli K99-Stämme bei Kälbern, die jünger als 3 bis 5 Tage alt waren (4, 21, 45, 46, 49, 60, 63, 66, 67, 68, 73).

Acres et al. (2) schlüsselten die Ergebnisse genau nach Altersgruppen auf und fanden bei durchfallkranken Kälbern, die jünger als 5 Tage waren, in 62% und bei Kälbern, die 5 bis 10 Tage alt waren, in 8% der Proben enterotoxische E. coli-Keime. Durchfallkranke Kälber blieben an dem 12. Lebenstag frei von enterotoxischen E. coli-Keimen.

2.1.4. Kryptosporidien

Kryptosporidien wurden bei Kälbern im Dünndarm erstmals im Jahre 1971 nachgewiesen (56). In Durchfallproben gelang der Nachweis von Kryptosporidien erst 1978 (58). Zwischenzeitlich wurden Kryptosporidien weltweit aus Kotproben von Kälbern mit Diarrhoe nachgewiesen. Kryptosporidien wiesen in den meisten Untersuchungen nach den Rotaviren die größten Nachweisraten auf. Die Prozentzahlen im einzelnen unterlagen aber relativ starken regionalen Schwankungen und bewegten sich im Bereich 14 bis 61% (39, 63).

In der Bundesrepublik wurden in 37 bis 39% der Kotproben durchfallkranker Kälber Kryptosporidien gefunden (27, 32). Die Nachweisraten in Dänemark lagen bei 16% (34), in Ungarn und der Schweiz bei ca. 27% (53) und in England zwischen 24 und 60% (60, 68, 72). In den außereuropäischen Ländern bewegten sich die Prozentzahlen zwischen 20% für Kanada (51), 61% für Australien (39), 35 bis 39% für die U.S.A. (6, 58). Bulgin et al. (17) ermittelten für die U.S.A. einen Prozentsatz Kryptosporidien-positiver Kotproben, der unter 10% lag.

Auch bei gesunden Kälbern war der Befund vielfach positiv. So schieden in der Bundesrepublik Deutschland



14 % (32), in Ungarn 4% (53), in England zwischen 7 und 17% (63,66) und in den U.S.A. 7% (49) der Kälber ohne Durchfallerkrankungen Kryptosporidien aus.

Kryptosporidien wurden von Kälbern zwischen dem 5. Lebenstag und der 4. Lebenswoche ausgeschieden (22, 27, 49, 53, 58, 59, 65, 68, 71, 75). Die positiven Befunde konzentrierten sich aber auf die Zeitspanne zwischen dem 6. und 17. Lebenstag (49, 58). Snodgrass und Mitarbeiter (68) fanden die höchsten Nachweisraten um den 12. Lebenstag. Dagegen gelang nie der Nachweis vor dem 5. Lebenstag (22). Die Dauer der Ausscheidung betrug 3 bis 15 Tage (71).

2.2. Mischinfektionen

Mischinfektionen mit Rota- und Coronaviren, enterotoxischen E. coli K99-Keimen und Kryptosporidien spielten eine wichtige Rolle bei den Kälberdurchfällen.

Der Anteil der Mischinfektionen insgesamt lag in England zwischen 15 und 21% (60, 67, 68). Davon entfielen auf Doppelinfektionen zwischen 15 und 17% und auf Dreifachinfektionen zwischen 0,3 und 3% (60, 68).

In Holland wies man Mischinfektionen bei 33% der untersuchten Kälber (22) und in den U.S.A. bei 20% nach (17). In Kanada fanden Acres et al. (1) in 38% der Proben zwei oder mehr der oben genannten Erreger. In einer Untersuchung lag der Anteil der Mischinfektionen sogar über dem der Monoinfektionen (51).

Rotaviren fanden sich am häufigsten in Verbindung mit Coronaviren. In Kanada wurden bei 54% aller Durchfallerkrankungen Rota- und Coronaviren in den Kotproben nachgewiesen (42), in Spanien waren es 13% (70). Etwas seltener ließen sich Rotaviren auch zusammen mit Kryptosporidien (68) und enterotoxischen E. coli-Keimen aus Kälberkotproben isolieren (1, 2, 14, 49, 51).

Coronaviruserkrankungen wurden in Durchfallproben neugeborener Kälber vor allem zusammen mit Rotaviren (1, 21, 42, 49), BVD-Virus (1, 42) und Kryptosporidien (42, 51, 68) nachgewiesen.

Enterotoxische E. coli K99-Keime wies man in Kotproben sehr häufig zusammen mit Rotaviren nach (1, 2, 14, 49, 51). Der prozentuale Anteil der Mischinfektionen mit Rotaviren an den insgesamt E. coli K99-positiven Kotproben lag z.B. in der Bundesrepublik Deutschland bei 23% (14), In England bei 14% (63), in Kanada bei 16% (2) bzw. 40% (51) und in den U.S.A. bei ca. 50% (49). Mischinfektionen mit enterotoxischen E. coli-Keimen und Coronaviren oder Kryptosporidien blieben dagegen relativ selten (22).

Bei den Kryptosporidien waren Mischinfektionen häufiger als Monoinfektionen (1, 51). Dabei wurden sowohl Rotaviren als auch enterotoxische E. coli-Keime zusammen mit Kryptosporidien aus Durchfallproben von Kälbern isoliert (22, 48, 53, 60). In Kanada waren bei 11% der Kryptosporidieninfektionen Rotavirus- und/oder Coronaviruserkrankungen beteiligt (51). In den U.S.A. lag der Anteil der Mischinfektionen zwischen Kryptosporidien und Rota- und Coronaviren bei 10% (6, 49, 58).

2.3. Nachweisverfahren

2.3.1. Rota- und Coronaviren

Für die Laboratoriumsdiagnose von Rota- und Coronaviren wurden bisher folgende Verfahren beschrieben:

- a) Elektronenoptischer Nachweis,
- b) Immunfluoreszenztest (IFT),
- c) Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) und
- d) Hämagglutinationstest (HA) bzw. Hämadsorptions-
Elutions-Hämagglutinationstest (HEMA).

Der Vorteil des elektronenoptischen Nachweises ist der geringe Zeitaufwand. Er setzt allerdings Erfahrung des Untersuchers voraus, da vor allem die Coronaviren wegen ihres Pleomorphismus leicht mit anderen Viruspartikeln verwechselt oder übersehen werden können (9, 23, 81). Durch die Untersuchung der Kotproben mit dem Elektronenmikroskop lassen sich jedoch eventuell andere, möglicherweise noch wenig oder nicht bekannte Erreger nachweisen (73).

Der Nachweis durch die Immunfluoreszenztechnik kann ohne Anzüchtung des Virus direkt an Darmepithelzellen oder Kotproben durchgeführt werden (16, 44, 81). Daneben kann verdächtiges Material (Kotsuspension oder Darmschleimhautverreibung) auf Affennierenzellen verimpft und in den virushaltigen Zellen dann 18 bis 24 Stunden später mittels Immunfluores-

zenz Antigen nachgewiesen werden (9). Die Immunfluoreszenz ist aber bisher nur beim Rotavirusnachweis eingesetzt worden. Grundsätzlich ist der elektronenoptische Nachweis empfindlicher (21)

Einen großen Fortschritt beim Nachweis der Rota- und Coronaviren bedeutete die Entwicklung des Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA). Der Vorteil des ELISA ist die hohe Empfindlichkeit sowie die einfache und schnelle Durchführbarkeit (46). Von allen bekannten Nachweismethoden ist ELISA am empfindlichsten (21, 70).

Auf der Grundlage des von Sharpee et al. (62) beschriebenen Hämagglutinations-Testes sowie Hämadsorptions-Testes wurden zwei Methoden zum direkten Nachweis von Coronaviren in Kotproben erkrankter Kälber entwickelt. Vor allem der HEMA-Test soll ebenso empfindlich sein wie der ELISA (25). Beide Tests haben sich aber bisher in der Praxis noch nicht gegen den ELISA durchsetzen können.

2.3.2. Enterotoxische E. coli-Keime

Die Nachweisverfahren für enterotoxische E. coli-Keime konzentrieren sich auf die Bestimmung der Virulenzfaktoren, Enterotoxinbildung (hitzestabiles Enterotoxin) und Adhäsion (K99-Antigene). Zum Nachweis der Enterotoxinbildung können der Darmligaturtest und der Baby-

maustest herangezogen werden. Der Darmligaturtest ist empfindlicher, dafür aber aufwendiger (14). Für Routineuntersuchungen besser geeignet ist der Nachweis von Anheftungsfimbrien mit dem K99-Antigen, da alle bekannten enterotoxinbildenden, bovinen *E. coli*-Stämme das K99-Antigen besitzen (31, 38, 47). Der K99-Nachweis kann direkt mit der Kotprobe oder nach bakteriologischer Anzucht und Isolierung der *E. coli*-Keime erfolgen. Zur Anzucht eignen sich Minca-Agar oder Minca-Agar mit 1% Isovitalex (30). Die Bebrütungszeit muß bei normalem Minca-Agar 6 - 8 Stunden und bei Minca-Agar mit Isovitalex 20 bis 24 Stunden bei 37°C betragen. Die Identifizierung der K99-Antigens erfolgt mittels Objektträgerschnellagglutination mit spezifischem Immunserum (14, 29, 47). Subkultivierungen müssen vermieden werden, da sonst das plasmidgebundene K99-Antigen verlorengeht (29, 31), was zu "falsch"-negativen Ergebnissen führt.

Sehr viel schneller durchzuführen ist der K99-Nachweis mit dem ELISA. Mit diesem Test kann auch ohne vorherige Anzucht der Kotprobe das K99-Antigen direkt in der Kotprobe nachgewiesen werden (19, 25, 26, 45).

Mit Hilfe der "mannose-resistenten" Hämagglutination lassen sich Anheftungsfimbrien unabhängig vom Serotyp nachweisen. Die Hämagglutination wird auf dem Objektträger mit Minca-Kulturen und frischen Erythrozyten durchgeführt (14).

2.3.3. Kryptosporidien

Der Nachweis von Kryptosporidien ist am besten über die Untersuchung von Kotproben durchzuführen. Bei verendeten Tieren muß der Nachweis sehr schnell erfolgen, da bereits 12 Stunden post mortem aufgrund der Autolyse, ein histologischer Nachweis nicht mehr gelingt (58). Bei der Untersuchung von Sektionsmaterial kann der Nachweis der verschiedenen Entwicklungsstadien der Kryptosporidien im methanolfixierten und nach Giemsa gefärbten Präparaten der Ileumschleimhaut geführt werden.

Für den Nachweis der Oozyten/Sporozysten im Kot werden Kottausstriche methanolfixiert und anschließend nach Giemsa gefärbt (32, 58). Neben der Giemsa-Färbung eignet sich auch die modifizierte Ziehl-Neelsen-Färbung (35) oder die Grocott-Gomori-Methanin-Silbermethode (7).

Umstritten ist die Eignung des Flotationsverfahrens mit Zuckern und unterschiedlichen Salzlösungen. Der Nachweis mit dem Flotationsverfahren ist weniger empfindlich als der mit dem Giemsa-gefärbten Kottausstrichpräparat (32). Die besten Ergebnisse werden bei Verwendung von Kochsalzlösung als Flotationsflüssigkeit erzielt (32). Anderson et al. (5) sehen den Vorteil der Flotationsmethode darin, daß sie, im Gegensatz zur Färbemethode, auch routinemäßig in der tierärztlichen Praxis durchgeführt werden kann, da die Oozyten ihre normale Morphologie nahezu beibehalten und durch die Anreicherung im Flotationsverfahren auch nicht so leicht übersehen werden können.

Heine (33) hat ein Nachweisverfahren beschrieben, bei dem die Lichtbrechung der Nativstadien in einem Ölfilter zur Diagnostik ausgenützt wird. Diese Methode hat sich aber in der allgemeinen Diagnostik der Kryptosporidien nicht durchgesetzt.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Untersuchungsmaterial

Insgesamt wurden 1021 Kotproben, die von durchfallkranken Kälbern aus dem Raum Süddeutschland stammten, untersucht. Die eingesandten Proben wurden keiner besonderen Auswahl unterzogen, sondern waren Teil des täglich in der Routinediagnostik anfallenden Untersuchungsmaterials. Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich auf die Jahre 1984, 1985 und auf das erste Halbjahr 1986.

3.1.2. Anzüchtung

Die Kotproben wurden zur Untersuchung auf hämolysierende E. coli-Keime auf Blut- (10% Schafblut) und Gassner-Agar mittels Dreiösenausstrich angezüchtet und 18 - 24 Stunden bei 37°C bebrütet.

3.1.3. K99-Nachweis im Mikro-ELISA

Zur Beschichtung der ELISA-Lochplatten diente ein K99-Antikörper vom Kaninchen. Die beschichteten und mit Folien verschlossenen Platten wurden bis zur Verwendung bei 4°C bis 8°C gelagert. Die Kotproben wurden vor dem Test in NaCl-Phosphatpuffer mit 0,5% Tween aufgeschwemmt (im Verhältnis 1:5), mit Ultraschall homogenisiert und anschließend zur Abtrennung grober Bestandteile zentrifugiert (30 Min./2000 g). Die Beschichtung der Platten erfolgte mit unterschiedlichen

Verdünnungen des Fäzesüberstandes. Für den Test fand ein monoklonales K99-Antikörper-Peroxidase-Konjugat¹⁾ Verwendung. Das Substrat bestand aus 0,5 g o-Phenylendiamin plus 4,67 g Zitronensäure plus 9,15 g NaH_2PO_4 pro 1 Aqua dest. Unmittelbar vor Gebrauch wurde 0,005% H_2O_2 zugegeben. Die Ablesung erfolgte nach einer Reaktionszeit von 10 Minuten mit einem Photometer (Flow) bei 450 nm. Als positiv wurden Proben bewertet, bei denen der Extinktionswert das dreifache einer entsprechenden Negativprobe betrug.

3.1.4. Rotavirusnachweis im Mikro-ELISA²⁾

Die Kotproben wurden, in Anlehnung an die von Bachmann (10) beschriebene Methode, mit der doppelten Antikörper-Sandwichtechnik auf das Vorkommen von Rotavirusantigenen untersucht. Die Platten wurden mit Anti-Rotavirus-Globulin vom Kaninchen beschichtet, mit Folien verschlossen und bei 4°C gelagert. Die Beschichtung der Platten erfolgte mit aufbereiteten Fäzesproben (vgl. K99-ELISA) in den Verdünnungen 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16 und mit Meerrettichperoxidase-markiertem Rotavirusantikörperkonjugat. Nach Zugabe des Substrates (vgl. K99-ELISA) wurde nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten bei Zimmertemperatur mit einem Photometer (Flow) bei 450 nm abgelesen. Als positiv galten Proben, deren Extinktionswerte über 1.150 lagen.

1) Ascitesflüssigkeit eines K99 Hybridomas, die uns freundlicherweise von Dr. Cordowsky, Fa. Genetics, Minnetonka, Minn., U.S.A. zur Verfügung gestellt wurde.

2) Die Untersuchungen wurden von Herrn Dr. W. Eichhorn und Fr. Heilmann durchgeführt.

3.1.5. Coronavirusnachweis im Hämagglutinationstest¹⁾

Die Hämagglutination wurde mit dem Überstand einer Fäzesaufschwemmung in NaCl-Phosphatpuffer (1:5), mit 1% fötalem Kälberserum und einer 0,5%igen Rattenerythrozytensuspension durchgeführt. Nach Zugabe der Erythrozyten wurden die Platten geschüttelt und 3 Stunden bei Zimmertemperatur belassen. Proben mit einem Hämagglutinationstiter über 1:400 wurden zur Spezifizierung einer Hämagglutinationshemmungsreaktion mit spezifischen Coronavirus-Immunseren unterzogen.

3.1.6. Nachweis von sporulierten Oozyten und Sporozysten der Kryptosporidien²⁾

Der Kot wurde möglichst dünn auf Objektträgern ausgestrichen und luftgetrocknet. Im Anschluß an die Fixierung mit Methanol (5 Minuten) erfolgte die Färbung mit einer kombinierten May-Grünwald-Giemsa-Färbung in der Färbeküvette nach folgender Methode: 5 Minuten färben mit May-Grünwald (50% Stammlösung plus 50% Aqua dest.) - kurz abtropfen lassen und sofort 30 Minuten mit Giemsa-Lösung (4% Stammlösung plus 96% Aqua dest.) nachfärben - kurz abtropfen lassen und sofort für ca. 3 Sekunden in 0,5%ige Essigsäure (in Aqua dest.) verbringen - lufttrocknen lassen. Die Auswertung erfolgte durch Mikroskopieren mit einem 40er Objektiv. Die Kryptosporidien stellen sich als 5µm große, runde, ungefärbte, wie ausgestanzt aussehende Löcher im Ausstrich dar. Das Zytoplasma ist hellblau gefärbt und schollig. Im Zytoplasma liegen rot bis violett gefärbte, an einer Stelle konzentrierte etwa 1µm große Granula.

1) Die Untersuchungen wurden von Dr. Eichhorn und Fr. Heilmann durchgeführt.

2) Die Untersuchungen wurden von Dr. Göbel im Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie durchgeführt.

3.2. Ergebnisse

Von Januar 1984 bis Juli 1986 wurden insgesamt 1021 Kotproben durchfallkranker Kälber systematisch auf Rotaviren, Coronaviren, Kryptosporidien und enterotoxische E. coli K99-Keime untersucht. Einen Überblick über die Verbreitung der einzelnen Erreger insgesamt und aufgeschlüsselt nach den verschiedenen Jahren gibt Tabelle 1.

Im Untersuchungszeitraum 1984 bis 1986 wurden in den Kotproben am häufigsten Rotaviren nachgewiesen. Der Anteil der rotaviruspositiven Kotproben betrug insgesamt 22%. Die Nachweisraten bei den anderen Erregern lag etwas niedriger. Coronaviren ließen sich in 11% und Kryptosporidien in 17 % der Proben nachweisen. Bei den Kryptosporidien wurde je nach Erregergehalt zwischen + bis ++ und +++ bis ++++ unterschieden. Der Hauptanteil (14%) entfiel dabei auf den schwach positiven Gehalt. Nur 3% der Kotproben wiesen einen starken Kryptosporidienbefall (+++ bis ++++) auf.

Wie aus der Tabelle 1 weiter ersichtlich wird ließen sich in fast allen Kotproben (94%) Escherichia coli-Keime nachweisen. Aber nur in 12% der Proben konnte K99-Antigen festgestellt werden. 4 % der isolierten E. coli-Keime zeigten eine Hämolysebildung.

Beim Vergleich der einzelnen Jahre fällt bei allen Erregern ein ansteigender Trend auf. Dieser Anstieg ist bei den Rotaviren (1984: 15% und 1986: 33%) bei den Coronaviren und bei den Kotproben mit stark positivem Kryptosporidienbefall (1984: 3% und 1986: 5%) besonders stark ausgeprägt.

Tabelle 1: Überblick über das Vorkommen und die Verbreitung wichtiger, enteropathogener Erreger bei durchfallkranken Kälbern in Süddeutschland

Untersuchungs- zeitraum	n	Anteil der positiven Kotproben						
		Rota- 1) viren	Corona- 2) viren	Kryptosporidien			Escherichia coli	
				gesamt	+ - ++	+++ - ++++	gesamt	K99 ⁺ häm ⁺
1984	476	15%	7%	18%	15%	3%	93%	12% 6%
1985	401	27%	14%	17%	14%	3%	94%	11% 3%
1986 (6 Monate)	144	33%	14%	18%	13%	5%	95%	14% 3%
1984 - 1986	1021	22%	11%	17%	14%	3%	94%	12% 4%

Unterschiede in den Jahren

1) Signifikanz bei $P < 0,001$

2) Signifikanz bei $P < 0,01$

Durchfallerkrankungen treten bei neugeborenen Kälbern das ganze Jahr über auf. Es war deshalb interessant, nachzuprüfen, ob einzelne Erreger in einer bestimmten Jahreszeit besonders häufig vorkommen. Wie die Ergebnisse in Tabelle 2 zeigen, waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Jahreszeiten nur unwesentlich, so daß man nicht von einer jahreszeitlichen Dominanz eines Erregers sprechen kann.

Die Durchfallerkrankungen der Kälber konzentrieren sich auf die ersten beiden Lebenswochen, wobei der Krankheitsbeginn durchaus variieren kann. Deshalb wurden die Untersuchungsergebnisse nach Tieren aufgeschlüsselt, bei denen der Durchfall a) in den ersten 5 Lebenstagen, b) zwischen dem 6. und 10. Lebenstag und c) nach dem 11. Lebenstag auftrat. Bei dieser Auswertung konnte nur ein Teil der Proben berücksichtigt werden, da sich anhand der Vorberichte nicht immer ein Bezug zum Erkrankungsbeginn herstellen ließ. Den in Tabelle 3 zusammengefaßten Ergebnissen kann man entnehmen, daß Unterschiede bezüglich des zeitlichen Auftretens einzelner Erreger bestanden. Im Falle der Rota- und Coronaviren nahm die Nachweishäufigkeit mit zunehmendem Alter der Kälber ab, im Falle der Kryptosporidien und enterotoxischen E. coli-Keime dagegen zu.

Ein wichtiger Punkt für die Aussagekraft einer diagnostischen Untersuchung ist der Einfluß des Zeitpunktes einer Probenentnahme auf die Nachweishäufigkeit. Um diese Frage abzuklären, wurden die Ergebnisse auch nach dem Entnahmetag aufgeschlüsselt in Kotproben, die a) 0 bis 1 Tag, b) 2 bis 3 Tage, c) 4 bis 5 Tage und d) über 6 Tage nach Beginn des Durchfalls entnommen worden waren (Tabelle 4). Die Nachweisrate war bei fast allen Erregern im wesent-

Tabelle 2: Vorkommen wichtiger enteropathogener Erreger in Kotproben durchfall-
kranker Kälber in Abhängigkeit zur Jahreszeit

Untersuchungs- zeitraum (1984 - 1986)	n	Anteil positiver Kotproben			
		Rotaviren	Coronaviren	Kryptosporidien ¹⁾	E. coli K99 ⁺ 2)
Frühjahr	288	20%	13%	20%	7%
Sommer	146	18%	11%	17%	19%
Herbst	199	24%	10%	24%	14%
Winter	388	25%	9%	12%	11%

1), 2) Unterschiede in den Jahreszeiten

Signifikanz bei $P < 0,01$

Tabelle 3: Vorkommen wichtiger enteropathogener Erreger bei durchfallkranken Kälbern in Abhängigkeit zum Alter

Alter der Kälber bei Beginn der Erkrankung	n	Anteil positiver Proben			
		Rotaviren	Coronaviren	Kryptosporidien ¹⁾	E. coli K99 ⁺
1 - 5 Tage	261	36%	14%	15%	12%
6 - 10 Tage	218	33%	9%	26%	13%
> 11 Tage	81	26%	11%	20%	20%

1) Unterschiede zwischen den Altersgruppen
Signifikanz bei $P < 0,01$

lichen unabhängig davon, ob die Probe kurz nach Beginn des Durchfalls oder später, im Verlauf der Durchfallerkrankung, entnommen wurde. Eine Ausnahme bildeten die Coronaviren, bei denen die Nachweisrate in den spät entnommenen Proben wesentlich niedriger lag.

Wie bereits eingangs erwähnt, kommen bei den neonatalen Durchfallerkrankungen auch Mischinfektionen vor. In unserem Untersuchungsmaterial ließen sich in 14% der Kotproben 2 und in weniger als 1% (n=10) der Proben 3 oder 4 Erreger nachweisen. 49% der Kotproben blieben negativ und 36% der positiven Proben enthielten nur einen Erreger (vgl. Tab. 5).

Einen Überblick über die Erregerkombinationen in den mehrfach positiven Kotproben gibt Tabelle 6. Am häufigsten sind Rotaviren in mehrfach positiven Kotproben zu finden und zwar unabhängig von der Erregerkombination. Wie Tabelle 6 aber zeigt, kann man grundsätzlich davon ausgehen, daß jeder der hier untersuchten enteropathogenen Erreger allein oder mit einem anderen Erreger in einer Durchfallprobe vorkommen kann.

Tabelle 4: Vorkommen wichtiger enteropathogener Erreger bei durchfallkranken
Kälbern in Abhängigkeit zum Entnahmetag

Entnahme (Tage nach Be- ginn der Er- krankung)	n	Anteil positiver Proben			
		Rotaviren	Coronaviren	Kryptosporidien	E. coli K99 ⁺
0 - 1	101	37%	14%	31%	15%
2 - 3	122	34%	21%	18%	9%
4 - 5	44	23%	11%	25%	16%
> 6	37	35%	5%	22%	16%

Tabelle 5: Überblick über das Vorkommen negativer, einfach und mehrfach positiver Faecesproben bei durchfallkranken Kälbern

Zahl der untersuchten Proben	Anteil der negativen Proben	Anteil der positiven Proben		
		mit 1 Erreger	mit 2 Erregern	mit 3 Erregern
1021	49%	36%	14%	< 1% (n = 10)

Tabelle 6: Überblick über mögliche Erregerkombinationen bei mehrfach positiven
Faezesproben von durchfallkranken Kälbern

Erstbefund	Nachweis Häufigkeit anderer Erreger			
	Rotaviren	Coronaviren	Kryptosporidien	E. coli K99 ⁺
Rotaviren (n = 228)		18%	21%	14%
Coronaviren (n = 107)	40%		17%	12%
Kryptosporidien (n = 179)	30%	10%		10%
E. coli K99 ⁺ (n = 122)	27%	11%	14%	

4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

In Süddeutschland ließen sich in den Kotproben durchfallkranker Kälber Rota- und Coronaviren, Kryptosporidien und enterotoxische *E. coli* K99-Keime nachweisen. Die Bedeutung dieser Infektionserreger am Durchfallgeschehen wurde dadurch unterstrichen, daß praktisch jede zweite Durchfallprobe einen oder mehrere dieser Erreger enthielt. In vergleichbaren neueren Untersuchungen in England wurden sogar in 72% (68) bzw. 69% (60) der Kotproben enteropathogene Erreger gefunden. Der etwas höhere Prozentsatz kam wahrscheinlich dadurch zustande, daß in diesen Untersuchungen noch andere Erreger (z.B. *Salmonella* spp., BVD-Virus) miteinbezogen wurden.

Der Anteil der Mischinfektionen lag bei den vergleichbaren Untersuchungen etwa in der gleichen Größenordnung. In Süddeutschland waren es 15%, in England 15 % bis 20% der Proben (60, 68). Bei den Mischinfektionen dominierten die Doppelinfektionen. Dreifachinfektionen hatten in Süddeutschland im Durchschnitt einen Anteil von weniger als 1%, in England zwischen 0,3% und 3%.

Am weitesten verbreitet waren Rotaviren. Bereits 1979 und 1980 wurden in Süddeutschland aus 40% der Kotproben durchfallkranker Kälber Rotaviren isoliert (14). Dieser Prozentsatz fiel zwar 1984 vorübergehend auf 15% , stieg aber wieder im Jahre 1985 auf 27 % und 1986 auf 33 %. Auch in anderen Regionen dominierten die Rotavirusbefunde. Der Prozentsatz rotaviruspositiver Proben lag z.B. in England bei 42% bis 50% (55, 60, 68), in Kanada bei 27% (1, 3, 42) und in den USA bei über 50% (47, 52).

Die Verbreitung der Coronaviren, mit einem Anteil von ca. 11% an den Gesamtisolaten, war bisher in allen

Ländern relativ einheitlich (42, 60, 68). Ebenso wiesen die in eigenen Testen ermittelten Fälle mit Kryptosporidien kaum Unterschiede zu vergleichbaren Untersuchungen auf (8, 60, 68, 74). Relativ stark variierten dagegen die Anteile der enterotoxischen *E. coli*-Keime. Die Prozentsätze lagen zwischen 3% bis 8% in England (60, 63, 68), 12% in den eigenen Untersuchungen und in den U.S.A. (47), 14% bis 27% in Kanada (1, 3) und 63% in Holland (31). Da sich die Nachweismethoden nicht wesentlich unterschieden, muß man davon ausgehen, daß bei diesem Erreger die größten regionalen und zeitlichen Unterschiede vorkommen.

Alle vergleichbaren Untersuchungen waren zeitlich relativ begrenzt. Das vorliegende Untersuchungsmaterial gab ein Bild über die epidemiologische Entwicklung bei Rota- und Coronaviren, Kryptosporidien und enterotoxischen *E. coli*-Keimen über einen Zeitraum von 2 1/2 Jahren. In diesem Zeitabschnitt wurde bei allen Erregern ein leicht ansteigender Trend beobachtet, der aber, da alle Erreger betroffen waren, letztlich nicht zu einer Spektrumsveränderung führte. Der einheitliche Anstieg überraschte, denn in den letzten 2 Jahren wurden in Süddeutschland vermehrt Muttertiervaccinen gegen Rota- und Coronaviren sowie *E. coli*-Keime eingesetzt. Da die Vorberichte zu den eingesandten Kotproben keine Hinweise auf eine vorausgegangene Muttertierimpfung im Bestand enthielten, kann man annehmen, daß die Kotproben von durchfallkranken Kälbern nicht vaccinierter Kühe stammten. Dies wird durch die Erfahrungen aus Feldversuchen bestätigt. Beim Vorliegen entsprechender Infektionserreger konnten die neonatalen Durchfallerkrankungen durch den Einsatz einer Muttertiervaccine im letzten Trächtigkeitsdrittel erfolgreich

bekämpft werden (11, 12, 24). Aufgrund der hier gezeigten epidemiologischen Situation ist es durchaus sinnvoll, die bekannten Muttertiervaccinen in den Problembeständen Süddeutschlands weiter einzusetzen.

Für die Behandlung bzw. Prophylaxe der Kryptosporidieninfektion gab es in der Praxis noch keine spezifischen Bekämpfungsmaßnahmen. Die Verdoppelung des Anteils stark positiver Kotproben in den letzten 2 1/2 Jahren auf ca. 5% macht deutlich, wie wichtig die Entwicklung wirksamer, spezifischer Bekämpfungsmaßnahmen auch gegen die Kryptosporidiose der Kälber ist. Experimentelle Therapieversuche mit Lasalocid^R sind jetzt erfolgversprechend verlaufen und lassen auf ein wirksames und unschädliches Präparat für die breite Anwendung in der Praxis hoffen (28).

Trotz der relativ hohen Nachweisraten für die hier untersuchten Erreger darf man aber nicht übersehen, daß immer noch die Hälfte der untersuchten Durchfallproben "negativ" blieben. Dies könnte 2 Gründe haben. Einmal kommen andere Durchfallursachen in Betracht und zum anderen ein nicht geeignetes Untersuchungsmaterial. Sehr häufig wurde in diesem Zusammenhang diskutiert, daß der Entnahmezeitpunkt einen Einfluß auf die "Trefferquote" nimmt. Diese Annahme konnte in unseren Untersuchungen nur für den Coronavirusnachweis bestätigt werden, denn bei Durchfallproben, die erst 4 Tage nach Beginn der Erkrankung entnommen wurden, war deren Nachweisrate deutlich erniedrigt. Für Rotaviren, Kryptosporidien und enterotoxische E. coli-Keime konnte dies nicht bestätigt werden. Bei der bakteriologischen Anzucht von Kotproben, die mehrere Tage nach Beginn der Erkrankung ent-

nommen worden waren, fiel auf, daß regelmäßig neben den E. coli-Keimen Proteus-Bakterien als Begleitflora wuchsen. Dies wirkte sich auf den K99-Nachweis nicht nachteilig aus, da der ELISA ohne vorherige Anzüchtung der Kotproben durchgeführt wurde. Als Nachteil erwies sich das Proteus-Wachstum nur in Bezug auf den Einsatz stall-spezifischer E. coli-Vaccinen, für deren Herstellung die Isolierung des enterotoxischen E. coli-Keimes in Reinkultur Voraussetzung ist.

Die neonatalen Durchfallerkrankungen belasten die Kälberaufzucht in den ersten 14 Lebenstagen. Trotz der begrenzten kritischen Lebensphase ließen sich durchaus zeitliche Unterschiede im Auftreten der Durchfälle feststellen. Die meisten Durchfälle beginnen vor allem in den ersten 3 Lebenstagen oder zwischen dem 6. und 8. Lebenstag. Wir fanden auch zeitliche Unterschiede beim Nachweis einzelner Erreger. Coronaviren konnten deutlich häufiger bei Kälbern im Alter von 1 bis 5 Tagen Kryptosporidien sowie E. coli K99-Keime dagegen häufiger bei älteren Kälbern nachgewiesen werden. Bis auf die E. coli K99-Keime entspricht dieser Befund den bekannten Ergebnissen (15, 60, 68, 74). Warum das E. coli-Ergebnis eine Ausnahme macht, ist schwer zu erklären und bedarf weiterer Untersuchungen.

Jahreszeitliche Häufungen wurden bei den einzelnen Erregern nicht festgestellt. Man kann davon ausgehen, daß die neonatalen Kälberdurchfälle in jeder Jahreszeit dasselbe Erregerspektrum aufweisen, d.h. die Bekämpfungsstrategie bleibt gleich, unabhängig davon, ob die Durchfallerkrankungen im Sommer oder Winter auftreten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In einem Zeitraum von 2 1/2 Jahren wurden 1021 Kotproben von durchfallkranken Kälbern aus Süddeutschland auf das Vorkommen von Rota- und Coronaviren, Kryptosporidien und enterotoxischen E. coli-Keimen untersucht. Der Erregernachweis erfolgte mit dem ELISA (Rotavirus, E. coli K99), der Hämagglutination bzw. dem Hämagglutinationshemmungstest (Coronavirus) und der mikroskopischen Kontrolle gefärbter Ausstriche (Kryptosporidien).

Rotaviren konnten in 22%, Coronaviren in 11% und E. coli K99-Keime in 12% der Durchfallproben nachgewiesen werden. 14% der Kotproben hatten einen niedrigen und 3% einen hohen Gehalt an Kryptosporidien. Von 1984 bis 1986 war bei allen Erregern ein leicht ansteigender Trend feststellbar.

In 36% der Kotproben ließ sich nur eine Erregerart nachweisen, 14% der Proben enthielten 2 und weniger als 1% 3 verschiedene Erregerarten.

Jahreszeitliche Unterschiede im Vorkommen der einzelnen Erregerarten wurden nicht gefunden. Der Zeitpunkt der Probenentnahme hatte nur auf den Coronavirusnachweis Einfluß. Bei Kälbern, die jünger als 5 Tage waren, konnten Rota- und Coronaviren und bei älteren Kälbern (6 - 14 Tage) Kryptosporidien und E. coli K99 häufiger nachgewiesen werden.

6. SUMMARY

The incidence and spread of important diarrhoeal pathogens among newborn calves in South Germany in the period 1984 - 1986

Over a period of 2 1/2 years 1021 faeces samples taken from calves suffering from diarrhoea in South Germany were analysed for the incidence of rota and corona viruses, cryptosporidia and enterotoxigenic E. coli bacteria. The presence of the pathogens was proven by the ELISA (rotavirus, E. coli K99), the haemagglutination or haemagglutination-inhibiting test (coronavirus) and by examination of coloured smears under the microscope.

Rotaviruses were detected in 22% of the faeces samples, corona viruses in 11% and E. coli K99-bacteria in 12% of the samples. 14% of the faeces samples had a low proportion of cryptosporidia, while 3% showed a high proportion. From 1984 - 1986 a slightly increasing trend could be observed among all the pathogens.

In 36% of the faeces samples only one pathogen was found, whereas 14% of the samples contained 2 and less than 1% contained 3 pathogens. Seasonal variations in the incidence of the separate pathogens were not found. The time of sampling only had an influence on the detection of the corona virus. Among calves younger than 5 days rota- and coronaviruses could be detected more often, while cryptosporidia and E. coli K99 were found to be more frequent among calves of 6 - 14 days.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Acres, S.D., C.J. Laing, J.R. Saunders and O.M. Radostits, 1975: Acute undifferentiated neonatal diarrhea in beef calves. I. Occurrence and distribution of infectious agents. Can. J. Comp. Med. 39, 116
2. Acres, S.D., 1976: The epidemiology of the calf scours complex in Western Canada. Proceedings: Minisymposium on Neonatal Diarrhea in Calves and Pigs, May 3th and 4th, University of Saskatchewan
3. Acres, S.D. J.R. Saunders and O.M. Radostits, 1977: Acute undifferentiated neonatal diarrhea of beef calves: The prevalence of enterotoxigenic E. coli, reo-like (rota) virus and other enteropathogens in cow-calf herds. Can. Vet. J. 18, 113
4. Acres, S.D. and L.A. Babiuk, 1978: Studies on rotaviral antibody in bovine serum and lacteal secretions using radioimmunoassay. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 173, 555
5. Anderson, B.G., 1981: Patterns of shedding of cryptosporidial oocysts in Idaho calves. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 178, 982

6. Anderson, B.C. and R.F. Hall, 1982: Cryptosporidial infection in Idaho dairy calves.
J. Amer. Vet. Med. Assoc. 181, 484
7. Angus, K.W. , J. Campbell, E.W. Gray and D. Sherwood, 1981: Staining of faecal yeasts and Cryptosporidium oocysts.
Vet. Rec. 107, 173
8. Angus, K.W., 1983: Cryptosporidiosis in man, domestic animals and birds: a review.
J. Roy. Soc. Med. 76, 62
9. Bachmann, P.A., 1977: Neue virale Durchfallerkrankungen beim Kalb.
Tierärztl. Umsch. 10, 524
10. Bachmann, P.A., 1979: Rotavirusnachweis in Faezes: Erfahrungen mit dem Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).
Zbl. Vet. Med. B 26, 835
11. Bachmann, P.A., G. Baljer, X. Gmelch, W. Eichhorn, P. Plank and A. Mayr, 1984: Vaccination of cows with K99 and Rotavirus antigen: Potency of K99 antigen combined with different adjuvans in stimulating milk antibody secretion.
Zbl. Vet. Med. B 31, 660
12. Bachmann, P.A., W. Eichhorn, G. Baljer, H. Wieda, P. Plank, W. Becker und A. Mayr, 1985: Muttertierimpfungen gegen Diarrhoen bei Kälbern. Ergebnisse eines Feldversuches.
Tierärztl. Umsch. 40, 8

13. Baljer, G., 1977: Erfahrungen mit der oralen Schutzimpfung von Kälbern gegen *Escherichia coli*.
Tierärztl. Umsch. 10, 527
14. Baljer, G. und P.A. Bachmann, 1980: Nachweis enteropathogener *Escherichia coli*-Stämme und Rotaviren in Kotproben von Kälbern mit Diarrhoe.
Zbl. Vet. Med. B 27, 806
15. Boch, J., E. Göbel, J. Heine, U. Brändler und L. Schloemer, 1982: Kryptosporidien-Infektion bei Haustieren.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 95, 361
16. Bridger, J.C. and G.N. Woode, 1975: Neonatal diarrhea: identification of a reo-virus-like agent in faeces by immunofluorescence and immune electron microscopy.
Brit. Vet. J. 131, 528
17. Bulgin, M.S., B.C. Anderson, J.F. Evermann, A.C.S. Ward, 1982: Infectious agents associated with neonatal calf disease in southwestern Idaho and eastern Oregon.
J. Amer. Vet. Assoc. 180, 1222
18. Cancellotti, F.M., C. Turilli, A. Gentile and G. Gagliardi, 1976: Reo-like virus responsible for diarrhea in newborn calves.
Atti. Soc. Ital. Buiatr. 8, 179

19. De Graff, F.K., P. Klemm and W. Gaastre, 1981:
Purification, characterization and
partial covalent structure of the
adhesive antigen K99 of *Escherichia*
coli.
Infect. Immun. 33, 877
20. De Leeuw, P.W., 1976: Rotavirus-infection in
calves.
Tijdschr. Diergeneeskd. 101, 1298
21. De Leeuw, P.W., D.J. Ellens, P.J. Straver, J.A.
M. von Balken, A. Moerman and T.
Baanvinger, 1980: Rotavirus in-
fections in calves in dairy herds.
Res. Vet. Sci. 29, 135
22. De Leeuw, P.D., A. Moerman, J.M.A. Pol, F.P.
Talmon and F.G. van Zijderveld,
1984: Epidemiological observations
of cryptosporidiosis in dairy herds
in the netherlands.
Proceedings of XIIIth world congress
on diseases of cattle. Volume 1,
p. 104, Durban Republic of South
Africa
23. Dirksen, G. und P.A. Bachmann, 1977: Zum Vorkom-
men von Rota- und Coronavirus als
Ursache von Kälberdiarrhoe in der
BRD.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 90,
475

24. Eichhorn, W., P.A. Bachmann, G. Baljer, P. Plank
und P. Schneider, 1982: Vakzinierung
hochträchtiger Rinder mit einem kom-
binierten Rotavirus/E. coli K99-
Impfstoff zur Prophylaxe von Durch-
fallerkrankungen bei neugeborenen
Kälbern.
Tierärztl. Umsch. 37, 599
25. Ellens, D.J., J.A.M. von Balken and P.W. De Leeuw,
1978: Diagnosis of bovine coronavirus
infections with hemabsorption-elution-
haemagglutination assay (HEHA) and
with enzyme-linked-immunosorbent
assay (ELISA).
In: Proc. 2nd. Internat. Symp. on Neona-
tal Diarrhea; Oct. 3-5, 1978, University
of Saskatchewan, Saskatoon, Sask, Kanada
26. Ellens, D.J., P.W. De Leeuw and H. Rozemond, 1979:
Detection of the K99 antigen of Esche-
richia coli in calf feces by enzyme-
linked-immunosorbent assay (ELISA).
Vet. Q. 1, 169
27. Fiedler, H.H., K.H. Bähr and R. Hirchert, 1982:
Beitrag zur Kryptosporidien-Invasion
bei Kälbern.
Tierärztl. Umsch. 37, 497
28. Göbel, E., 1986: Possibilities of therapy of
Cryptosporidiosis in calves in
problematic farms.
Zbl. Bakt. Hyg. A im Druck

29. Guinée, P.A.M., W.H. Jansen and C.M. Agterberg, 1976: Detection of the K99 antigen by means of agglutination and immunoelectrophoresis in *E. coli* isolates from calves and its correlation with enterotoxigenicity.
Infect. Immun. 13, 1369
30. Guinée, P.A.M., J. Veltkamp and W.H. Jansen, 1977: Improved minca-medium for the detection of k99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *E. coli*.
Infect. Immun. 15, 676
31. Guinée, P.A.M. and W.H. Jansen, 1979: Detection of enterotoxigenicity and attachment factors in *Escherichia coli* strains of human, porcine and bovine origin: a comparative study.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 243, 245
32. Heine, J., J. Boch, 1981: Kryptosporidien-Infektionen beim Kalb, Nachweis, Vorkommen und experimentelle Übertragung.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 94, 289
33. Heine, J., 1982: Eine einfache Nachweismethode für Kryptosporidien im Kot.
Zbl. Vet. Med. B 29, 324

34. Henriksen, S.A. und H.V. Krogh, 1980: A note on bovine infections with cryptosporidia in Denmark.
Nord. Vet. Med. 32, 501
35. Henriksen, S.A. and J. Pohlenz, 1981: Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique.
Acta. vet. scand. 22, 594
36. Hess, R.G., P.A. Bachmann, G. Baljer, A. Mayr, A. Pospischil and G. Schmid, 1984: Synergism in Experimental Mixed Infections of Newborn Colostrum-Deprived Calves with Bovine Rotavirus and Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC).
Zbl. Vet. Med. B 31, 585
37. Horner, G.W. R. Hunter and C.A. Kirkbridge, 1975: A coronaviruslike agent present in faeces of calves with diarrhea.
New Zealand Vet. J. 23, 98
38. Isaacson, R.E., H.W. Moon and R.A. Schneider, 1978: Distribution and virulence of Escherichia coli in the small intestines of calves with and without diarrhea.
Amer. J. Vet. Res. 39, 1750
39. Jerret, J.V. and D.R. Snodgrass, 1981: Cryptosporidia associated with outbreaks of neonatal calf diarrhea.
Austr. Vet. J. 57, 434

40. Kornitzer, J. and R. Tamarin, 1979: zitiert von Reynolds et al., 1986 (Nr. 60). Refuah Veterinarith 36, 87
41. Langpap, T.J., M.E. Bergeland, E.D. Reeed, 1979: Coronaviral Enteritis of young calves: virologic and pathologic findings in naturally occurring infections. Amer. J. Vet. Res. 40, 1476
42. Marsolais, G., R. Assaf, C. Montpetit and P. Marois, 1978: Diagnosis of viral agents associated with neonatal calf diarrhea. Can. J. comp. Med. 42, 168
43. Martel, J.L. and B. Perrin, 1981: zitiert von Reynolds et al., 1986 (Nr. 60). Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires, 81 - 4b, 45
44. Mebus, C.A., E.L. Stair, M.B. Rhodes and M.J. Twiehaus, 1975: Neonatal calf diarrhea: propagativ attenuation and characteristics of a coronavirus-like agent. Amer. J. Vet. Res. 34, 145
45. Mills, K.W. and K.L. Tietze, 1984: Monoclonal Antibody Enzyme-Linked-Immunsorbent Assay for Identification of K99 positive E. coli Isolates from Calves. J. Clin. Microbiol. 19 (4), 498

46. Moerman, A., P.W. De Leeuw, F.G. von Zijder-
veld, T. Baanvinger and J.W.A.
Tiessink: Prevalence and signifi-
cance of viral enteritis in dutch
diary calves.
Proceedings of XIIth world con-
gress on Diseases of cattle. Vo-
lume 1, p. 228, The Netherlands
47. Moon, H.W., S.C. Whipp and S.M. Skartvedt, 1976:
Etiologic diagnosis of diarrheal
diseases of calves: Frequency and
methods for detecting enterotoxin
an K99 antigen production by Esche-
richia coli.
Amer. J. Vet. Res. 37, 1025
48. Moon, H.W., B. Nagy, R.E. Isaacson and I. Ors-
kov, 1977: Occurence of K99 antigen
on Escherichia coli isolated from
pigs and colonization of pig ileum
by K99 enterotoxigenic E. coli from
calves and pigs.
Infect. Immun. 15, 614
49. Moon, H.W., A.W. McClurkin, R.E. Isaacson,
Y. Pohlenz, S.M. Skadtvedt, K.G.
Gillette and A.L. Baetz, 1978:
Pathogenic relationships of rota-
virus, Escherichia coli and other agents
in mixed infections in calves.
J. Amer. vet. med. Assoc. 173, 577

50. Morin, M., P. Lamothe, A. Gagnon and R. Malo,
1974: A case of viral neonatal calf
diarrhea in a Quebec dairy herd.
Can. J. comp. Med. 38, 236
51. Morin, M., S. Larivière and R. Lallier, 1976:
Pathological and micorbiological ob-
servations made on spontaneous cases
of acute neonatal calf diarrhea.
Can. J. Comp. Med. 40, 228
52. Myers, L.L., B.D. Firehammer, M.M. Border and
D.S. Shoop, 1984: Prevalence of
enteric pathogens in the feces of
healthy beef calves.
Amer. J. Vet. Res. 45, 1544
53. Nagy, B. und J. Pohlenz, 1982: Die bovine Kryptospori-
diose: Diagnose und Therapie. Eine Litera-
turübersicht und Möglichkeiten zur Diagno-
se und Therapie.
Tierärztl. Prax. 10, 163
54. McNulty, M.S., J.B. McFerran, D.G. Bryson, E.F.
Logan and W.L. Curran, 1976: Studies
on rotavirus infection and diarrhea
in young calves.
Vet. Rec. 99, 229
55. McNulty, M.S. and E.F. Logan, 1983: Longitudi-
nal survey of rotavirus infection
in calves.
Vet. Rec. 113, 333

56. Pancierera, R.J., R.W. Thomassen and F.M. Garner,
1971: Cryptosporidial infection in
a calf.
Vet. Path. 8, 479
57. Pohl, P., P. Lintermans, A. Kaeckenbeek, K. van
Muylen und C. Schlicker, 1984:
zitiert von Reynolds et al., 1986
(Nr. 60).
Ann. Méd. Vétér. 128, 119
58. Pohlentz, J., H.W. Moon, H.F. Cheville and
W.J. Bemrick, 1978: Cryptosporidio-
sis as a probable facotr in neona-
tal diarrhea of calves.
J. Amer. Vet. Med. Assoc. 172, 452
59. Pol, J.M., B.E.C. Schreuder, G.J. Kok and P.W.
DeLeeuw, 1982: Cryptosporidium:
a "new" factor in the aetiology
of neonatal diarrhea in calves.
Tijdschr. Diergeneeskd. 107, 503
60. Reynolds, D.J., J.H. Morgan, N. Chanter, P.W.
Jones, J.C. Bridger, T.G. Debney
and K.J. Bunch, 1986: Microbiology
of calf diarrhea in southern Bri-
tain.
Vet. Rec. 119, 34
61. Scherrer, R., J. Cohen, R.L'Haridon, C. Fey-
nerol and J.C. Fayet, 1976: Reo-
virus-like agent (rotavirus) asso-
ciated with neonatal calf Gastro-

enteritis in France.

Ann. Rech. Vétér. 7, 25

62. Sharpee, R.L., C.A. Mebus and E.P. Bass, 1976:
Characterization of a calf diarrheal
coronavirus.
Amer. J. Vet. Res. 37, 1031
63. Sherwood, D., D.R. Snodgrass and G.H.K. Lawson,
1983: Prevalence of enterotoxigenic
Escherichia coli in calves in Scot-
land and northern England.
Vet. Rec. 113, 208
64. Shiraishi, T. et al., 1980: Outbreaks of diarrhea
in cows caused by bovine coronavi-
rus infection.
J. Jap. Vet. Med. Assoc. 33, 70
65. Snodgrass, D.R., K.W. Angus, E.W. Gray, A.W.
Keir and L.W. Clerihew, 1980: Crypto-
sporidia associated with rotavirus
and an E. coli in an outbreak of
calf scour.
Vet. Rec. 106, 458
66. Snodgrass, D.R., D. Sherwood, H.G. Terzolo and
B.A. Synge, 1982: A field survey
of the aetiology of neonatal calf
diarrhea.
In: Proceedings of the XIIth world con-
gress on diseases of cattle, Volume 1,
p. 380, Amsterdam, The Netherlands.

67. Snodgrass, D.R. and D. Sherwood, 1983: Aetiology of diarrhea in young calves.
In: Proceedings of IVth International Symposium on Neonatal Diarrhea, p. 162
Oct. 3-5, 1983, University of Saskatchewan, Saskatoon, Sask, Kanada
68. Snodgrass, D.R., H.R. Terzolo, D. Sherwood, J. Campbell, J.D. Menzies and B.A. Synge, 1986: Aetiology of diarrhea in young calves.
Vet. Rec. 119, 31
69. Sokolova, M.L., I.T. Sattorvo, L.A. Minkova, V.S. Avilov and V.K. Sologue, 1982: Coronavirus as a cause of diarrhea in newborn calves (in Russ.).
Veterinariya 11, 26
70. Solana, A., C. Gomez-Tejedor, M.A. Marcotegui and J.M. Castro, 1984: Preliminary survey of prevalence of bovine rotavirus and coronavirus in Spain.
In: Proceedings of XIIIth world congress on diseases of cattle. Volume 1, p. 21, Durban Republic of South Africa
71. Stein, E., J. Boch, J. Heine und G. Henkel, 1983: Der Verlauf natürlicher Kryptosporidium-Infektionen in vier Rinderzuchtbetrieben.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 96, 222

72. Tzipori, S., J. Campbell, D. Sherwood, D.R. Snodgrass and A. Whitelaw, 1980:
An outbreak of calf diarrhea attributed to cryptosporidial infection.
Vet. Rec. 107, 579
73. Tzipori, S., 1981: The aetiology and diagnosis
on calf diarrhea.
Vet. Rec. 108, 510
74. Tzipori, S., 1983: Cryptosporidiosis in animals
and humans.
Microbiol. Rev. 47, 84
75. Tzipori, S., M. Smith, C. Halpin, K.W. Angus,
D. Sherwood and J. Campbell, 1983:
Experimental cryptosporidiosis in
calves: Clinical manifestation and
pathological findings.
Vet.Rec. 112, 6
76. Ueda, H., N. Terakado, T. Sekizaki, K. Hasimoto
and K. Takesue, 1982: Distribution
of enterotixigenic Escherichia coli
in diarrheal calves and healthy cattle.
Jap. J. Vet. Sci. 44, 751
77. White, R.G., C.A. Mebus and M.J. Twiehaus, 1970:
Incidence of herds infected with a
neonatal calf diarrhea virus.
Vet. Med. Small. Anim. Clin. 65,
487

78. Woode, G.N. and J.C. Bridger, 1975: Viral enteritis of calves.
Vet. Rec. 96, 85
79. Woode, G.N., 1976: Viral diarrhea in calves.
Vet. Ann. 16, 30
80. Woode, G.N., 1976: Pathogenic rotaviruses isolated from pigs and calves.
In: Acute diarrhea in childhood.
Ciba Foundation Symp. 42, Elsevier Medica, North Holland
81. Woode, G.N., J.C. Bridger and A. Meyling, 1978: Significance of bovine coronavirus infection.
Vet. Rec. 102, 15
82. Zygraich, N., A.M. Georges and E. Vascoboinic, 1975: Aetiology of diarrhea in newborn calves. Results of a serological study relating to reo-like and corona-viruses in the Belgian cattle population.
Ann. Med. Vétér. 119, 105

Herrn Prof. Dr. H. Mahnel danke ich für die Überlassung des Themas und die gebotene Möglichkeit zur Erstellung der Arbeit.

Bei Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. habil. G. Baljer möchte ich mich herzlich für die wissenschaftliche Betreuung und die großzügige Unterstützung während der Fertigstellung dieser Arbeit bedanken.

Herrn Dr. W. Eichhorn und Dr. W. Göbel danke ich für die Durchführung der Untersuchungen und für die Überlassung der notwendigen Unterlagen.

L E B E N S L A U F

Geboren: 09.08.1954 in Freudenstadt

Vater: Erwin Wolf

Mutter: Margarete Wolf, geb. Ziegler

Volksschule: 1960 - 1964 in Freudenstadt

Realschule: 1964 - 1968 in Freudenstadt

Gymnasium: 1968 - 1970 im Knabeninstitut Wilhelmsdorf
1970 - 1972 im Kepler-Gymnasium Freudenstadt
1972 - 1975 in der Eduard-Spangler-Schule Freudenstadt

Abitur: 19. Juni 1975

Berufsausbildung: Landwirt, Abschluß 27. Juni 1978

Studium: 1978 - 1981 Agrarwissenschaften an der Universität Göttingen
1981 - 1986 Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Staatsexamen: 13 Februar 1986

Approbation: 29. Juli 1986

